

MALIGNI TUMORI

MALIGNANT TUMOURS

Biljezi i citološke osobitosti tumora

Markers and Cytological Characteristics of Tumours

Melita Nakić, Vesna Žižić

Klinika za dječje bolesti Zagreb

10000 Zagreb, Klaićeva 16

Sažetak Članak daje pregled mogućnosti citodijagnostike i tumorskih biljega u ranom otkrivanju i dijagnosticiranju malignih bolesti, posebno u djece, te prognostičko značenje u terapijskom praćenju bolesnika. Obradene su citodijagnostičke metode uz suvremenu uporabu novih tehničkih mogućnosti na citološkim razmazima. U dijagnostici malignih tumora, među ostalim dijagnostičkim postupcima, važno mjesto ima i određivanje tumorskih biljega u serumu. Tumorski su biljezi tvari kojih prisutnost ili povišenje koncentracije ili aktivnosti s velikom vjerojatnošću označuje prisutnost malignog tumora. Tumorski biljezi mogu biti antigeni, hormoni, proteini i enzimi. Niz godina su naponi istraživača i kliničara usmjereni otkrivanju tzv. idealnog tumorskog biljega visoke dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti.

Ključne riječi: maligne bolesti, citodijagnostičke metode, dijagnoza, klasifikacija, tumorski biljeg

Summary The paper gives a review of the possibilities of cytodiagnostic and tumor markers in the early detection and diagnostics of malignant diseases, especially in children and prognostic importance in therapeutic follow-up of the patients. An analysis is made of cytodiagnostic methods and modern use of new technical possibilities in cytological smears. In malignant tumour diagnostics, among other diagnostic procedures, determination of tumour markers in the serum has a significant role. Tumour markers are substances whose presence, increased concentrations, or activity indicates with great probability the presence of a malignant tumour. Tumour markers can be divided in the following manner: antigens, hormones, proteins and enzymes. For many years research efforts have been focused on finding the so called "ideal" tumour marker of a high diagnostic sensitivity and distinctiveness.

Key words: malignant disease, cytodiagnostic methods, diagnosis, classification, tumour markers

Maligne bolesti u stalnom su porastu. Najčešći su uzrok smrtnosti i u djece, osobito do 14. godine života te su na drugome mjestu iza nesretnih slučajeva. U djece se maligne bolesti razlikuju od onih u odraslih. Približno 50% čine leukemije i limfomi, a 50% solidni tumori. U odnosu na leukemije u odraslih u djece se češće pojavljuju akutne limfocitne od akutnih nelimfocitnih leukemija. Danas su pojedini tipovi, posebno akutnih limfocitnih leukemija, i pojedinih solidnih tumora izlječivi, stoga je važno malignu bolest rano prepoznati, dijagnosticirati i klasificirati, što je i preduvjet odabira učinkovitih terapijskih programa, a time i uspjeha terapije (1). Na tablici 1. prikazana je učestalost pojedinih malignih bolesti u djece.

Citologija se temelji na pretpostavci da svaki patološki proces pa tako i tumorski ima svoje karakteristične stanične pa se mišljenje, a često i dijagnoza, donosi proučavanjem izgleda pojedinačnih stanica u nakupinama međusobnog odnosa pojedinih staničnih elemenata pregledom cijelog razmaza. Citodijagnostika je metoda

Tablica 1. Relativna učestalost malignih tumora u djece

	%
Leukemije	30,9
Tumori središnjega živčanoga sustava	18,3
Limfomi (NHL, HL)	13,8
Tumori simpatičkoga živčanoga sustava	7,8
Tumori mekih tkiva	6,2
Tumori bubrega	5,8
Tumori kosti	4,7
Retinoblastom	2,5
Tumori gonada	2,0
Tumori jetre	1,3
Teratomi	0,4
Ostali tumori	6,3

Legenda:

NHL= ne-Hodgkinov limfom

HL= Hodgkinov limfom

s pomoću koje se nastoji doći do dijagnoze proučavanjem morfologije pojedinih stanica u obojenim razmazima.

Citodijagnostičke metode

Citodijagnostičke metode dijele se u:

- eksfolijativne
- aspiracijske
- metoda otiska (im-print).

Eksfolijativnim metodama analiziraju se deskvamirane stanice i one koje su se iz tkiva izdvojile u ekskrate i sekrete. Ova metoda bavi se proučavanjem stanica u tekućinama. *Aspiracijskom citodijagnostikom* analizira se materijal dobiven punkcijom iz dubine različitih organa ili patoloških tvorbi. U materijalu dobivenom aspiracijom stanice su vrlo dobro sačuvane i na njima se lakše uočavaju morfološke pojedinosti. Metoda otiska najčešće se upotrebljava pri intraoperativnom donošenju mišljenja o vrsti patološkog procesa. Ovaj je način ujedno najprikladniji za uspoređivanje s patohistološkim nalazom jer se iz istovjetnog materijala uzima citološki razmaz i radi patohistološka analiza.

Uzorak se rabi za pripremu razmaza za citodijagnostiku, citokemijske analize, imunocitokemijske analize, kinetičke metode digitalnom analizom slike - "image analysis", molekularne tehnike (*in situ* hibridizacija, PCR *in situ*). Nadalje isti materijal može se iskoristiti za pripremu suspenzija za ispitivanje na protočnom citometru (fenotipizacija, određivanje proliferacijskih antigena, određivanje količine DNK) i za mikrobiološke pretrage bilo za direktnu analizu, kulturu i antibiogram te biološki pokus (2, 3).

Razmaz se boji metodom po May-Grünwald-Giemsi (MGG) nakon što se razmazi osuše na zraku.

Za donošenje odluka o citološkoj dijagnostici malignih bolesti prijeko je potrebno izvanredno poznavanje stanice, tkiva i organa. Zloćudnost procesa prepoznaje se na osnovi izgleda i promjene jezgre, odnosa jezgre i citoplazme, rasporeda stanica u razmazu, posebno njihova nakupljanja u određene formacije, kao npr. formacije rozeta kod neuroblastoma.

Citomorfologija u dijagnostici akutnih leukemija

Citomorfološki nalaz razmaza periferne krvi i punktata koštane srži temeljna je dijagnostička pretraga u akutnih leukemija. Naime, morfološke analize tkiva i stanica pod svjetlosnim mikroskopom pružaju prvu i najvažniju informaciju za postavljanje dijagnoze. Morfološka dijagnoza akutnih leukemija relativno je jednostavna zbog izrazite karakterističnosti morfologije leukemijske stanice.

Do danas je najprihvaćenija klasifikacija u većini hematoloških laboratorija u svijetu ona koju su 1976. godine predložili francusko-američko-britanski hematolozi,

Tablica 2. Morfološka klasifikacija akutnih leukemija (AL) prema FAB-grupi

Skupina	Tip
ALL	L-1
	L-2
	L-3
AML	M-0
	M-1
	M-2
	M-3
	M-4
Eritroleukemija Megakarioblastična	M-5
	M-6
	M-7

poznata pod nazivom FAB-klasifikacija (6). Prema toj klasifikaciji (tablica 2) akutne leukemije (AL) dijele se u akutne limfocitne (ALL) i akutne nelimfocitne (ANLL). ALL se dijele u L-1, L-2 i L-3, a ANLL u M-0, M-1, M-2, M-3, M-4, M-5, M-6 i M-7. Kriteriji za ovakvo svrstavanje stanica su: veličina stanice, izgled kromatina, oblik jezgre i nukleola te količina i bazofilija citoplazme.

Akutna nediferencirana leukemija (ANL) definirana je morfološki i citokemijski kao proliferacija nediferenciranih stanica. Dijagnoza ANL temelji se na primjeni citokemijskih reakcija, koje su također negativne i ne upućuju da su blasti limfoidnog ili mijeloidnog porijekla. Učestalost ove leukemije je 2 do 3%. Međutim, neke od ovih leukemija mogu se uključiti u ALL zbog sličnosti stanica limfoblastima, a posebice ako su PAS-negativne. Ove leukemije, ako se prati klinički tijek, ponašaju se slično limfocitima i praktički reagiraju na isti terapijski program. Ima autora koji zbog loše prognoze izdvajaju ovaj oblik leukemije iz grupe ALL, premda većina hematologa smatra da je akutna nediferencirana leukemija ekvivalent akutnoj limfocitnoj leukemiji.

Prognostičko značenje morfoloških klasifikacija odavno je uočeno. Predviđanja tijeka bolesti na osnovama morfološke dijagnostike proistekla su iz dugogodišnjeg kliničkog iskustva, a prognostička im je vrijednost potvrđena na velikom broju bolesnika. FAB-klasifikacija pruža vrlo visok stupanj reproducibilnosti zbog jasno određenih morfoloških kriterija, što je među ostalim i dovelo do upotrebe ove klasifikacije bilo da se radi o djeci ili odraslima gotovo u svim hematološkim centrima svijeta. Zadnjih godinu dana u upotrebi je nova citomorfološka klasifikacija malignih bolesti hematopoetskog sustava koja je prihvaćena od SZO-a (vidi članak prof. B. Labara), a koja uključuje osnove citomorfološke FAB-klasifikacije uz veću korelaciju s citogenetičkim nalazima, fenotipizacijom te molekularnim i kliničkim promjenama (8).

Uz morfološke značajke važna su citokemijske metode koje su sastavni dio rutinskih analiza leukemičnih stanica (3, 4).

Osobito su važne one citokemijske reakcije koje omogućuju otkrivanje specifičnih razlika kod morfološki sličnih stanica. U dijagnozi akutnih leukemija najčešće se rabe sljedeće citokemijske reakcije: peroksidaza (POX), periodic acid Schiff (PAS), alfa-naftil-acetat-esteraza (NASDA), kiselna fosfataza i beta-glukuronidaza.

Pozitivna peroksidaza karakteristična je za stanice koje odgovaraju morfološkom tipu mijelocitnih i promijelocitnih leukemija, pozitivna peroksidaza-esteraza karakteristična je za mijelomonocitnu vrstu akutnih leukemija, a pozitivna esteraza za monocitnu leukemiju. Pozitivna PAS-reakcija, kao i nediferencirani citokemijski tip akutnih leukemija karakteristični su uglavnom za limfoblastične leukemije. Čini se da je za pozitivitet PAS-reakcije odgovoran glikogen u stanici. PAS-reakcija je pozitivna u određenom broju limfoblasta u većini ALL-a. Izgleda da i supstancije u stanici poput glikolipida i glikoproteina mogu dati pozitivnu PAS-reakciju. Smatra se da zbog ovog razloga PAS-reakciju uvijek valja nadopuniti primjenom diastaze. PAS-reakcija je vrijedna nadopuna citomorfologiji i klasifikaciji ALL-a, međutim prognostička vrijednost ove citokemijske reakcije nije sa sigurnošću utvrđena.

Enzim kiselna fosfataza pokazao se korisnim u identifikaciji T-limfoblasta, koji se morfološkim značajkama mogu pouzdano razlikovati od ne-T, ne-B i B-limfoblasta. Nalaz kisele fosfataze pozitivan je u 30 - 70% T-limfoblasta, 10-20% B-limfoblasta te manje od 10% ne-T i ne-B-limfoblasta. Ultrastrukturna ispitivanja su pokazala da se granula kisele fosfataze u T-limfoblastima nalaze u Golgijevu aparatu i lizosomnim granulama u njegovoj neposrednoj blizini. Rijetka granula kisele fosfataze u B, ne-T i ne-B-limfoblastima nalaze se u citoplazmatskim lizosomima, a ne u Golgijevu aparatu. Izgleda da visok sadržaj ovog enzima u T-limfoblastima može biti odraz osobina limfocita timusnog podrijetla ili razlike u kinetici proliferacije T, B, ne-T i ne-B-limfoblasta. Naime, poznato je da se na mitotske stimulacije povisuje sadržaj kisele fosfataze u T-limfocitima za vrijeme premitotske faze, pa se pretpostavlja da otpuštanje lizosomnih enzima ima važnu ulogu u procesu blastičke transformacije i mitoze (3, 6, 7).

Današnje mogućnosti imunološke fenotipizacije akutnih leukemija imaju dijagnostičku važnost, često pomažu u diferencijalnoj dijagnozi dvojbjenih slučajeva (pojava nekoliko klonova maligno izmijenjenih stanica). Naime, imunofenotipizacija leukemijskih stanica omogućuje potvrdu morfološke dijagnoze, brzu i točnu klasifikaciju, što pomaže u odabiru ispravnog liječenja bolesnika (9). Imunofenotipizacija je posebno važna u djece s akutnom mijeloičkom leukemijom gdje ima i potvrđnu dijagnostičku ulogu, a posebno je nezaobilazna za dijagnozu nezrelih M-O, eritroidnih E-6 i megakarioblastnih M-7 oblika leukemije. Nova imunološka klasifikacija AL-a razlikuje i miješane ili bifenotipske akutne leukemije (BAL), koje se trebaju razlikovati od ostalih oblika ALL-a i AML-a s koekspresijom biljega (9, 10). Cilj novih istraživanja koja su u tijeku jest stvaranje imunološke klasifikacije AL-a na temelju bioloških osobitosti podvrsta AL-a i istraživanja njihova prognostičkog značenja.

Uloga citologije u solidnih tumora djece

Uspjeh liječenja pojedinih solidnih tumora ovisi o rano postavljenoj dijagnozi, preciznoj klasifikaciji tipa tumora i proširenju stadija bolesti (11). Danas se strategija terapijskih programa pojedinih tumora uvelike mijenja te se nakon postavljene dijagnoze pristupa kemoterapiji ili zračenju, kako bi se tumorska masa smanjila odnosno uništila. Time se u većini slučajeva kirurški zahvat ograničava na kasnije uklanjanje već reducirane tumorske mase, a izbjegava se veliki često mutilirajući kirurški zahvat. S obzirom na takav pristup u liječenju pojedinih solidnih tumora u djece, ne dolazi se odmah na početak liječenja do materijala za histološku analizu, koji zbog niza razloga može u to vrijeme biti kompromitiran, pa je citološka punkcija i analiza, kad god je to moguće za pacijenta, najbolji način za rano otkrivanje tumorske bolesti i postavljanje dijagnoze.

Jednako tako citologija je kao minimalno agresivna metoda važna za verifikaciju metastaza solidnih tumora ili rasapa u tjelesnim tekućinama (likvor, pleuralni izljev, ascites) čime se olakšava točnije utvrđivanje stadija bolesti i daljnjeg liječenja (11, 14).

U morfološkoj dijagnostici solidnih tumora prednost ima histološka metoda pretrage. Međutim, citološke pretrage, posebno aspiracijska (ubod tankom iglom) može biti od velike koristi. Ova je metoda možda zbog tehničkih razloga insuficijentnija kod koštanih tumora (premda kod nekih kao npr. osteosarkoma daje dobre rezultate), a djelomice i kod teratoma koji su građeni od više različitih tkiva. Kao što je naglašeno, ipak ova metoda daje točnu dijagnozu i kod koštanih tumora, posebno osteosarkoma i Ewingova sarkoma, a histološkom analizom dobiva se preciznija analiza tipova samog tumora, kao i rasprostranjenost tumorskog procesa (5, 15, 16).

Manjkavost u citomorfološkoj analizi materijala dobivenog punkcijom jest i u tome što se ne može dobiti uvid u odnos karakteristika svih sastavnih tkiva. S druge pak strane, punkcijskom iglom može se dospjeti u tumorske procese trbušne šupljine, prsnog koša, čime se izbjegava veći zahvat da bi se dobio materijal za histološku analizu.

Citološka punkcija može se ponavljati i time pratiti dinamika procesa, posebno tijekom terapije. Na kraju, dijagnostika metastaza malignih tumora je važno područje citodijagnostike. Najtočniji podaci dobivaju se istodobno citološkom i histološkom analizom stanica i tkiva nekog tumora. Tada naime dolazi do izražaja prednost jedne i druge dijagnostičke metode. Na tablici 3. prikazana je relativna učestalost solidnih tumora u djece.

Sve navedene solidne tumore moguće je dijagnosticirati jednom od citomorfoloških metoda, a korelacija s patohistološkim nalazom vrlo je visoka.

Neuroblastom

Neuroblastom je čest solidni tumor dječje dobi. Čini otprilike 50% svih tumora koji se pojavljuju u prvom mjesecu

Tablica 3. Solidni tumori u djece (relativna učestalost)

	%
Neuroblastom	13
Ganglioneuroblastom	7
Wilmsov tumor	10,1
Retinoblastom	5,7
Rabdomiosarkom	7,9
Ewingov sarkom	3,8
Osteosarkom	5,9
Hepatoblastom	1,5
Karcinom jetre	1
Teratom germinativnih krvnih stanica	2,7
Yolk-sac tumor	1,9
Timom	2
ne-Hodgkinov limfom	10
Hodgkinov limfom	8,4
Ostali tumori	19,1

života i oko 35% tumora koji se pojavljuju do druge godine života. Gotovo 80% neuroblastoma dijagnosticira se u djece mlađe od 5 godina. Ovaj tumor nastaje malignom transformacijom stanica neuralnoga grebena (pojava tumora na različitim mjestima u tijelu). Neuroblastom je biološki vrlo neobičan tumor, kod kojeg su uočene spontane regresije ili one inducirane terapijom te diferencijacija u razne dobroćudne oblike (ganglioneuroblastom, ganglioneurom) (19, 20).

Citološki se (tablica 4) u većini slučajeva nalaze stanice kubična oblika s umjerenom anizokariozom i pleomorfizmom. Kromatin je gust, a mogu biti prisutni i mali nukleoli. Citoplazma je vrlo blijeda i oskudna, iako može biti i umjereno obilna. Stanice se karakteristično grupiraju u formacije rozeta. Međutim, stanice pojedinih neuroblastoma mogu biti izrazito blastičnog tipa. Kada se radi o ganglioneuroblastomu, citoplazme mogu biti bazofilnije, stanice također formiraju rozete ili pseudorozete u kojima se ističe i nepodijeljenost stanice. Katkad je prisutna jaka vakuolizacija citoplazme. Kod neuroblastoma prisutna je i različito obilna karakteristična ružičasta intracelularna masa, koja kod ganglioneuroblastoma nedostaje.

Tablica 4. Neuroblastomska citomorfologija

- hipercelularni razmazi s brojnim individualnim malim stanicama, uz pojedine vrlo zgusnute nakupine jezgara
- nakupine golih jezgara često se vide
- stanice neuroblastoma imaju ovalne ili lagano nepravilne jezgre s vrlo finim granularnim kromatinom i malim neupadljivim nukleolima te različitim količinom citoplazme, pojedine stanice pokazuju diskretne citoplazmatske izdanke
- ganglijske stanice mogu biti binuklearne, multinuklearne, mogu sadržavati grubo granularni kromatin i prominentne nukleole
- Homer-Wrightove rozete gotovo uvijek prisutne

Tablica 5. Osteosarkomska citomorfologija

- stanice su ili pojedinačno raspršene ili se nalaze u nakupinama
- izražen pleomorfizam u veličini stanica / umjerene veličine do izrazito velikih, različita izgleda
- česta multinuklearnost stanica
- jezgre su obično ovalne, ali mogu biti pleomorfne, kromatin je gust, nukleoli mogu biti vrlo izraženi
- mitoze česte
- citoplazma je obilna, može biti fino granularna
- metakromatski obojeni osteoid prisutan je u staničnim nakupinama ili izolirano

Danas se citološki razmazi ovog tumora mogu iskoristiti za vrlo zahtjevne citogenetičke tehnike kao što je FISH (fluorescence in situ hybridization) kojom se otkrivaju translokacije, delecije, inverzija i amplifikacija kromosoma. S pomoću ove metode istražujemo N-myc-amplifikaciju, patološku ekspresiju onkogen na kromosomu 1, koja ima veliko prognostičko značenje u neuroblastoma. S pomoću protočne citometrije (Flow cytometry) može se također na citološkim razmazima analizirati količina DNK koja razlikuje tumore s vrijednosti u diploidnoj (2n), triploidnoj (3n) i tetraploidnoj (4n) regiji. Rezultati su pokazali da je triploidija češća u djece do 1 godine života i u I, II. i IV-S stadiju bolesti i da je bolji prognostički znak za razliku od neuroblastoma s DNK indeksom u 2n i 4n te starijoj životnoj dobi i s lošijim prognostičkim odgovorom na terapiju (19).

Osteosarkom

Osteosarkom pokazuje u pravilu izrazito polimorfnu morfološku sliku (tablica 5). Vrlo fina kromatinska struktura isprva izgleda gruba, zbog multiplog preklapanja stanica. Citoplazma je pjenušava i vakuolizirana. Jezgre su ovalne, s gusto granularnim kromatinom. Gigantske stanice sadržavaju jezgre različitih veličina (21, 22).

Ewingov sarkom

Citološki se nalaze lagano polimorfni okrugli nukleusi (tablica 6). Ako su stisnuti zajedno, imaju poligonalan

Tablica 6. Citomorfologija Ewingova sarkoma

- izrazita celularnost razmaza,
- stanice su pretežno pojedinačno raspršene u razmazu ili se grupiraju u manje nakupine,
- izgled stanica je monoton (malene okrugle stanice 2 do 3 puta veličine zrelog limfocita), vrlo fragilne,
- uniformne okrugle do ovalne jezgre, vrlo finog granularnog kromatina, nukleoli maleni ili odsutni,
- česte citoplazmatske vakuolarne promjene,
- mitoze česte

oblik. Kromatin je lagano retikulogranuliran, a nukleusi maleni, najčešće nevidljivi. Citoplazmatske vakuole mogu biti jako naznačene (23, 24)

Rabdomiosarkom

Ovaj je tumor prilično teško citološki dijagnosticirati zbog histološke različitosti dosad opisanih tipova. Međutim, citološka dijagnoza je moguća, a upravo neke podudarnosti sa stanicama Ewingova sarkoma, limfoblastima i mijeloblastima moguće je citološki lakše prepoznati i na taj način odlučiti o dijagnozi. Citokemijsko bojenje PAS-reakcijom također je pomoć u dijagnostici ovog tumora, jer je PAS-reakcija izrazito pozitivna u rabdomiosarkomu (mišićne stanice sadržavaju veliku količinu glikogena), dok su morfološki slične stanice neuroblastoma, malignog fibrocitnog histiocitoma, fibrosarkoma i sinovijalnog sarkoma obično negativne.

Stanice mogu pokazivati anizokariozu u razmazima, mogu biti grupirane u nakupine ili se nalaziti pojedinačno. Nadalje, citološka karakteristika nekih tipova rabdomiosarkoma je bizarnost i poliploidija stanica s vrlo uočljivim modrim nukleolom različite veličine. Katkad se nalaze izrazito velike stanice (gigantski tip) s vrlo uočljivim karakteristično zamagljenim nukleolima. Citoplazma može biti sivkastoplava i *izrazito vakuolizirana* (25).

Wilmsov tumor

Citološke osobine Wilmsova tumora su ove: s citomorfološkog stajališta ovaj je tumor sličan mikrocelularnom karcinomu pluća, Ewingovu tumoru, neuroblastomu te slabije diferenciranom retikulosarkomu. Klinički podaci, dob bolesnika, lokalizacija u lumbalnoj regiji, pomažu nam u isključivanju prethodno navedenih tumora. Wilmsov je tumor karakteriziran monotonim, poligonalnim stanicama. Kromatin je zgusnut, granuloretikularan. Citoplazma je u većini slučajeva oskudna i transparentna ili pak slabije vidljiva. Katkada je sivoplava i vakuolizirana. U stanicama Wilmsova tumora mogu se naći i mitoze, ali rjeđe nego kod retikulosarkoma. Stanice mogu biti formirane u guste nakupine, no ipak u kompaktnim sličnim grupama češće pokazuju tendenciju formiranja rozeta ili girlanda (5, 18).

Fibrosarkom

Ovaj tumor pokazuje izraziti polimorfizam stanica. Tumor je nediferenciran, prisutna je anizokarioza. Čest je nalaz fin i zgrušan kromatin te više mitotičkih oblika. Citoplazma je lagano vakuolizirana, a glavni tip stanica naglašen je elipsoidan. Česti nalaz prisutnih neutrofila upućuje na češću upalnu reakciju.

Limfoblastični limfom

Kod limfoma se nalaze brojne limfoblastične stanice, bez tendencije grupiranju, izrazito nježnog rahlog kromatina, koji može mjestimice biti kondenziran i retikularan, a jezgre pokazuju prisutnost nukleola. Stanice su

velike, a mogu pokazivati umjerenu anizokariozu, dok citoplazma može biti oskudna ili obilnija, modre do sivomodre boje, često izrazito vakuolizirana.

Hodgkinov limfom (HL)

Za citološku dijagnozu HL-a nuždan je citološki nalaz Reed-Stenbergove stanice, koja pokazuje izraziti polimorfizam u veličini stanice, broju nukleola, gradnji kromatina i obilnosti citoplazme, nalaz Hodgkinove stanice s iznimno prominentnim nukleolom. U pravilu su stanice izrazito velike, prisutni su brojni nukleoli, jezgra je izrazito reznjasta.

Citodijagnostika - zaključne napomene

Apsolutno je potrebno, gdje god je to moguće, učiniti patohistološku analizu, kako bi se potvrdila ili isključila citološka dijagnoza (26). Međutim, postoje brojne situacije u kojima je poželjna bilo aspiracijska bilo eksfolijativna citologija. Važno je spoznati i prihvatiti da su ova dva srodna morfološka pristupa u dijagnostici komplementarna. Posebno mjesto u citološkoj dijagnozi solidnih malignih tumora u djece zauzima pedijatrijska intraoperativna citodijagnostika - citopatologija (IOC) zbog velike pomoći kirurgu u prosudbi nastavka i tipa kirurškog zahvata, jer su i malobrojna istraživanja na tom području pokazala uspjeh ove metode te visok stupanj korelacije s patohistološkom dijagnozom (27). IOC se lako izvodi, korisno dopunjuje histološku dijagnozu, za koju ipak treba dulje razdoblje. Ova metoda osim što je od koristi kirurgu, koristi i patologu jer mu daje opću, a katkad i posebnu informaciju o prirodi lezije.

Dakle, maligni tumori u djece često su zbog citološke nediferenciranosti dijagnostički, diferencijalnodijagnostički i prognostički problem, a teško ih je i klasificirati. Ovo vrijedi osobito za tzv. embrionalne tumore. I granica između benignih i malignih tumora u dječjoj dobi katkada se teško može odrediti, što povlači za sobom opasnost da se maligni tumor previdi ili da se dijete podvrgne nepotrebnu i škodljivu liječenju. Tumori djeteta su, za razliku od tumora u odraslih, osjetljiviji na zračenje i kemoterapiju, pa su rezultati liječenja pojedinih tipova tumora bolji.

U zaključku valja naglasiti da je:

1. citomorfološkom metodom moguće je postaviti dijagnozu hemoblastoza i solidnih tumora ili upozoriti na njih,
2. citomorfološka metoda je brza, jednostavna, relativno neopasna i bezbolna metoda koju je moguće učiniti u većini laboratorija,
3. citomorfološkim nalazima materijala dobivenog jednom od citomorfoloških metoda moguće je pratiti dinamiku tumorskog procesa, posebno tijekom terapije, kao i uspjeh terapijskih protokola,
4. citomorfološkom metodom moguće je otkriti recidiv tumora kao i udaljene metastaze,

5. velika vrijednost citomorfološke metode je u obradi intraoperativno dobivenog materijala, a
6. korelacija s patohistološkom dijagnozom je vrlo visoka.

Tumorski biljezi

Tumorske stanice sintetiziraju ili induciraju sintezu proteina koji se luče u cirkulaciju, druge tjelesne tekućine ili su prisutni kao antigeni na površini stanica. Nazivamo ih i tumorskim biljezima (28 i 29). Niz godina su naponi istraživača i kliničara usmjereni k otkrivanju tzv. idealnog tumorskog biljega visoke dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti, koji će omogućiti:

- dijagnozu tumora u ranoj fazi,
- prognozu zloćudnih tumora,
- procjenu terapijskog odgovora,
- rano otkrivanje ponovne pojave zloćudnog tumora,
- pretraživanje asimptomatske populacije na određeni zloćudni tumor.

Da bi udovoljio ovim dijagnostičkim zahtjevima, tumorski biljeg treba imati visoku specifičnost (negativan u benignim bolestima i zdravim osobama), visoku osjetljivost (pozitivan u bolesnih osoba vrlo rano, kad je samo nekoliko malignih stanica prisutno). Treba biti specifičan za organ te njegova koncentracija u serumu mora biti u korelaciji sa stupnjem bolesti i/ili aktivnosti tumora (30).

Po kemijskom sastavu tumorski biljezi su najčešće proteini, a s obzirom na funkciju to su enzimi, hormoni i antigeni.

Onkofetalne bjelančevine

Poznato je nekoliko onkofetalnih proteina, to su: alfa-fetoprotein (AFP), karcinoembrionalni antigen (CEA), tkivni polipeptidni antigen (TPA), Tennessee antigen, gastrointestinalni karcinomski antigen (CA 19.9), ovarijski karcinomski antigen (CA 125), karbohidratni antigen (CA 15.3), antigen specifičan za prostatu (PSA), sijalinska kiselina, citokeratinski fragment (CYFRA 21-1), antigen sličan mucinu povezan s karcinomom (MCA), karbohidratni antigen 50, 195, 549 (CA 50, CA 195, CA 549) te mamarni serumski antigen (MSA).

Alfa-fetoprotein je glikoprotein koji stvaraju stanice fetalne jetre. Odmah poslije rođenja koncentracija mu u serumu opada. Povišena koncentracija kod odraslih osoba znak je maligne bolesti. Primarno se pojavljuje kod tumora jetre i testisa, ali i u metastazama kolona, karcinoma pankreasa, prostate te tumora ovarija (32). Umjereno povišenje koncentracije tog proteina nalazi se i u trećine bolesnika s akutnim i kroničnim hepatitisom te serumu trudnica u čiju krv dolazi perfuzijom iz amnionske tekućine koja je bogata alfa-fetoproteinom.

Pravodoban kirurški zahvat te uspješna kemoterapija ubrzo dovodi do pada koncentracije AFP-a. Međutim,

ponovni porast njegove koncentracije upućuje na napredak bolesti, bilo zbog povećanja mase primarnog tumora, bilo zbog razvitka metastaza.

Karcinoembrionalni antigen je također glikoprotein. To je antigen fetusa iz epitela endoderma, koji se potkraj graviditeta zamjenjuje drugim antigenom tipa odraslih osoba. Kod malignih tumora povisuje mu se koncentracija u serumu i smatra se da štiti stanične membrane malignih stanica.

Najčešće je povišen kod malignih tumora pankreasa, u slučajevima raka želuca, kolona, rektuma, dojke te u metastazama u jetri (33). Ni taj antigen nije strogo tumorski specifičan, pa se gdjekad pojavljuje i u benignim bolestima, kod ulcerativnog kolitisa i drugih bolesti probavnog trakta.

Osim u dijagnostičke svrhe, određivanje CEA je i koristan test za praćenje uspjeha terapije malignih tumora, jer se uklanjanjem malignog tumora njegova koncentracija u serumu snizuje, dok ponovni porast upućuje na recidiv tumora (34).

Tkivni polipeptidni antigen (TPA) membranski je protein fetalnih i malignih stanica, odakle dopijeva u krv. Povišen je kod raznih malignih tumora, a osobito kod karcinoma dojke (u 90% slučajeva).

Tennessee antigen je također glikoprotein vezan uz membranu malignih stanica. Dosta je specifičan za malignitet. Povišena koncentracija u serumu javlja se u 75-80% slučajeva karcinoma želuca, pluća, pankreasa i kolorektalnih tumora (35).

Gastrointestinalni karcinomski antigen (CA 19-9) također je glikoprotein, pretežno se nalazi u različitim tipovima gastrointestinalnog karcinoma. Osobito je osjetljiv (70-92%) i specifičan (96%) tumorski marker za tumor pankreasa. Povišene koncentracije ovog antigena nalaze se u serumu bolesnika s malignim tumorima želuca, kolona i rektuma te se smatra boljim pokazateljem tih karcinoma nego CEA (36).

Ovarijski karcinomski antigen (CA 125) glikoproteinski je tumorski marker visoke osjetljivosti (94%) i specifičnosti (89%) kod karcinoma ovarija, a osjetljivost u otkrivanju maligne bolesti povećava se ako se uz CA 19-9 odredi i CEA (37). Stalno povišenje vrijednosti upućuje na progresiju bolesti i loš učinak liječenja.

Karbohidratni antigen - CA 15.3 visoko je molekularni glikoprotein koji je prisutan u visokim koncentracijama u serumu bolesnika oboljelih od karcinoma dojke. Osobito je osjetljiv i bolji marker u odnosu na CEA u slučaju lokalnih i koštanih metastaza (38). CA 50 je tumorski marker za kolorektalni karcinom, dok je CA 195 noviji tumorski biljeg gastrointestinalnog karcinoma, osobito karcinoma pankreasa.

Do danas je poznato još nekoliko tumorskih biljega (CA 549, MSA, MCA) za karcinom dojke te služe za praćenje uspjeha terapije i otkrivanje relapsa bolesti (39).

Antigen specifičan za prostatu (PSA) glikoprotein je koji nalazimo u prostati oboljelih od hiperplazije i karcinoma. Znatno je osjetljiviji test na adenokarcinom prostate od prostatične kisele fosfataze (PAP) te dobro korelira s količinom tumorske mase (40).

Citokeratinski fragment (CYFRA 21-1) prisutan je u epitelnim stanicama bronha, oslobađa se iz tumorskih stanica i dobro korelira s histološkim tipom karcinoma i stadijem bolesti (41). Rabi se i za praćenje liječenja i rano otkrivanje relapsa.

Enzimi i izoenzimi

Aktivnost većine enzima povezana je s malignim rastom. Oni pokazuju karakteristične promjene aktivnosti koje su direktno povezane s količinom tumorske mase ili brzinom diobe tumorskih stanica. Te se promjene najčešće očituju u povećanju enzimске aktivnosti, pojavi izoenzima koji se ne nalaze u zdravih osoba, iako nisu isključene pojave smanjenja aktivnosti zbog prisutnosti malignog procesa. Najčešće i najviše rastu aktivnosti glikolitičkih enzima, u serumu bolesnika s metastazama zbog dezintegracije i diseminacije malignog procesa (42, 43). Tako je aktivnost **alkalne fosfataze** povišena kod primarnih tumora jetre i metastaza u jetri. Često se pojavljuje Reganov izoenzim, karakterističan za maligni rast u jetri, a po karakteristikama je sličan placentalnoj alkalnoj fosfatazi. Kod malignih tumora u kostima, osobito kod osteosarkoma, te metastaza u kostima raste aktivnost koštane alkalne fosfataze. Opstruktivni ikterus izazvan malignim tumorom obično prati viša aktivnost jetrenog izoenzima. Povišena aktivnost placentalne alkalne fosfataze najviše se rabi kao biljeg seminoma testisa, ali je prisutna i kod karcinoma pluća, ovarija i maternice.

Prostatična kisela fosfataza tumorski je biljeg za adenokarcinom prostate, a osobito se visoke aktivnosti u serumu nalaze kod koštanih metastaza tog tumora.

Izoenzim kreatin kinaze CK-BB rabi se kao osjetljiv marker za tumore većine organa kada se radi o adenokarcinomu pluća, bubrega, dojke, jajnika, jetre, a posebno u adenokarcinomu prostate. Ovaj se izoenzim normalno nalazi u moždanom i fetalnom tkivu, dok se u serumu zdravih osoba ne nalazi.

Maligno tkivo sadržava relativno mnogo glikolitičkih enzima, jer ima razvijenu glikolizu (povišene aktivnosti aldolaze, fosfoheksosa, LDH itd...). Porast aktivnosti **izoenzima** LDH4 i LDH5 prisutan je kod karcinoma dojke, metastaza u jetri, melanoma, limfoma, dok s druge strane dolazi do pada aktivnosti brzo pokretnih izoenzima (LDH1 i LDH2) (46). Indeks maligniteta koji je definiran kao omjer sporog LDH5 i brzog LDH1 izoenzima, u zdravoj populaciji je manji od 1, a kod bolesnika s malignim tumorom veći je od 1.

Beta-glukuronidaza (BG) enzim je koji igra bitnu ulogu u metabolizmu steroida i njezina je aktivnost u korelaciji s razinom estrogena u krvi, a kako su zloćudni tumori dojke hormonski ovisni, aktivnost tog enzima dobro korelira s kliničkom slikom tumora dojke i cerviksa.

U bolesnika s primarnim ili metastatskim procesom u jetri i pankreasu povišena je aktivnost serumske **d-glutamyltransferaze** (GGT), pri čemu je izrazito povećana aktivnost izoenzima GGT2. Za enzimsku dijagnostiku malignog procesa u jetri pouzdani se podaci

moгу dobiti istodobnim određivanjem aktivnosti GGT, LDH, alkalne fosfataze i 5' nukleotidaze.

Fosfo-hekso-izomeraza (PHI) enzim je anaerobnog metabolizma glukoze. U malignim bolestima povišena je aktivnost ovog enzima bez obzira na vrstu i lokalizaciju malignog procesa, pa se smatra nespecifičnim tumorskim biljegom.

U bolesnika s melanomom povišena je aktivnost **dioksifenilalaninske oksidaze** (DOPA-oksidaza) te je koristan tumorski biljeg malignog melanoma jer nisu poznata stanja pri kojima bi aktivnost tog enzima bila lažno pozitivna.

Neuronspecifična enolaza (NSE) dimerni je glikolitički enzim, nalazi se u većim količinama u živčanom tkivu i endokrinim žlijezdama, a i u malignim tumorima ovih tkiva (neuroendokrini tumor) (44).

Hormoni

Pojedini hormoni također imaju značenje tumorskih biljega. **Humani korionski gonadotropin** (HCG) najpoznatiji je hormonski tumorski biljeg posebno u koriokarcinoma (45). I maligni tumori pluća, želuca, gušterače, endometrija i hepatoma mogu ektopički producirati HCG.

Adenokortikotropni hormon (ACTH) mogu ektopički producirati karcinomi pluća, pankreasa i probavnog trakta, pa ga u tim slučajevima nalazimo u povišenim koncentracijama u serumu. **Inzulin** je pak povišen kod karcinoma pankreasa, uz izrazitu hipoglikemiju.

Kateholamini su važan tumorski biljeg, osobito u dijagnostici feokromocitoma i neuroblastoma. Prisutnost tih tumora rezultira povećanom produkcijom, a time i većom koncentracijom adrenalina, noradrenalina i vanilmandelične kiseline u serumu i urinu.

Povećana koncentracija **eritropoetina** nalazi se kod hepatoma, feokromocitoma i tumora bubrega, a **parathormona** kod tumora paratiroidne žlijezde.

U novije se vrijeme za određivanje vrste terapije malignih tumora rabe i hormonski receptori estrogena, progesterona, androgena i glukokortikoida.

Ostale bjelančevine

Monoklonalni imunoglobulini su specifični biljezi niza proliferativnih tumora posebice plazmocitoma i pratioci svih upalnih procesa. Rast nekih malignih stanica tumora prati povećana sinteza nekih serumskih proteina kao npr. **ceruloplazmina**. To je glikoprotein, čija je biološka uloga da oksidira resorbirano dvovalentno željezo u trovalentno. U malignih tumora, kao što su maligni limfomi te u Wilsonove bolesti dolazi do značajnijeg porasta koncentracije ceruloplazmina u serumu bolesnika. Kako molekula ceruloplazmina sadržava osam atoma bakra, s povišenjem koncentracije tog proteina istodobno dolazi i do povišene koncentracije serumskog bakra.

Feritin je nespecifičan tumorski biljeg. Povišena koncentracija u serumu nalazi se u akutnoj leukemiji, Hodgkinovoj bolesti te u karcinomu pluća, kolona, jetre i prostate.

Metali

Značajne promjene u tumorskom tkivu i serumu bolesnika s različitim zloćudnim bolestima pokazuju i neki metali. Određivanje **serumskog bakra** rabi se kao vrlo dobar tumorski biljeg malignih limfoma (Hodgkinov limfom). Svaka remisija bolesti praćena je sniženjem, pa čak i normalizacijom bakra u serumu, dok relapsu bolesti prethodi povišenje serumskog bakra. Svaki uspješan odgovor na terapiju Hodgkinove bolesti rezultira smanjenjem koncentracije serumskog bakra, pa se određivanje tog markera može smatrati specifičnim i vrlo osjetljivim označivačem u malignog limfoma. Porast koncentracije bakra više ovisi o brzini rasta malignih stanica nego o veličini tumora, pa je više pokazatelj bioloških karakteristika limfoma nego veličine tumorske mase. Maligni tumori nekih organa također pokazuju izrazito povišenje koncentracije serumskog bakra (npr. maligni tumor cerviksa).

Uz bakar, i **cink** je važan dijagnostički pokazatelj malignih bolesti, a posebno njegove povišene koncentracije u urinu bolesnika s hemoblastozama i Hodgkinovom bolesti. Izgleda da je nakupljanje cinka u krvnim stanicama značajno i za rani rizik zloćudne bolesti.

Tumorski biljezi - zaključne napomene

Za svaki maligni tumor postoji jedan ili više pogodnih biljega. Treba li za jednu vrstu tumora upotrijebiti samo jedan tumorski biljeg ili više njih? Općenito prevladava mišljenje da zbog njihove nedovoljne dijagnostičke specifičnosti i osjetljivosti treba rabiti više različitih tumorskih biljega istodobno. Razlikuju se mišljenja o broju tumorskih biljega i o tome koje rabiti kao primarne, a koje kao sekundarne. Istraživanja se nastavljaju, a s obzirom na razvoj osjetljivih metoda dijagnostike *in vitro* (RIA, EIA, imunohistokemija) te povećano razumijevanje karcinogeneze, očekuje se da će biti pronađeni tumorski biljezi visoke dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti, što će znatno pridonijeti dijagnozi i praćenju tijeka zloćudnih bolesti.

Literatura

1. TERACINI B. Aetiology and Epidemiology U: Voute PA, Barret A, Lemrle L, ur. Cancer in children. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1986:3-11.
2. KARDUN I. Klinička (neginekološka) citologija u svakodnevnoj praksi (tečaj trajnog medicinskog usavršavanja - Med. fakultet), knjiga sažetaka, str. 10-18, Zagreb 1998.
3. CARDOSO P LOPES. Atlas of clinical cytology. The Netherlands, 1973.
4. NAKIĆ M. Imunološka klasifikacija akutnih limfatičkih leukemija u djece u korelaciji s citomorfološkom i citokemijskom klasifikacijom. Medicinski fakultet Zagreb 1983; 156. Disertacija.
5. GRGIĆ Z, NAKIĆ M. Citomorfologija u dijagnostici dječjih malignih bolesti. Arh ZMD 1983;26:45-7.
6. BENNET JM, CATOWSKI D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG, GARLNICK HR, SULTAN C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. Br J Haematol 1976; 47:353-562.
7. CATOWSKY D, GALETTO J, OKOS A, MILIAMI E, GALTON AG. Cytochemical profile on N and T leucemic lymphocytes with special reference to acute lymphoblastic leukemia. J Clin Patol 1974; 27:767-71.
8. TOMONAGA M. New clasification of leukemia. Rinso Byori 2001;115:45-53.
9. BATINIĆ D. Imunološka fenotipizacija akutnih leukemija dječje dobi. Paediatr Croat 1997; 41 (Supl 1):83-9.
10. FINLAY JL, HANN HWL. Tumor markers U: D'Angio GJ, Sinniah D, Medows AT, Ewans EA, Pitchard J. Practical Pediatric Oncology, New York: Willey-Liss, 1992; 16-24.
11. MOTT MG. The Presentation, Management and Prognostic Solid Tumors of Childhood, Topics in Pediatrics, Hematology and Oncology. London: PH Moris Jones, Royal College of Physicians, 1979; 51-67.
12. GRANCY P, FINKLESTEIN JZ. Neuroblastoma pediatric therapy. New York: Carl Pochedly, 1979: 125-47.
13. NEIFELD JP. Neuroblastoma, Pediatric Tumors of the Genitourinary tract. New York: Liss Inc, 1980; 95 - 113.
14. ČEPULIĆ M, ABRAMOVIĆ V, NAKIĆ M, GOLUBIĆ-ČEPULIĆ B, JAVOROVIĆ B. Najnovija dostignuća i naša iskustva u kirurškoj terapiji plućnih metastaza u djece. Arh ZMD 1987; 31:277-89.
15. NAKIĆ M. Citološka dijagnostika solidnih tumora u djece. Jug Pedijatr 1991; 34:1-4.
16. NAKIĆ M, ČEPULIĆ M, PETKOVIĆ I, LENIČEK J, STEPAN J. Cytology in diagnosis of solid malignant tumors and lung metastases in children (abstract). Acta Cytologica 1994; 38 (4):647.
17. NAKIĆ M, STEPAN J, ČEPULIĆ M, PETKOVIĆ I, LENIČEK J. Advantages of exfoliative Cytology Analysis in the

- Diagnosis of Malignant Lymphoma in Children (abstract). *Acta Cytologica* 1994;38 (4):648.
18. NAKIĆ M, STEPAN J, PETKOVIĆ I, ČEPULIĆ M, LENIČEK J. Cytology in diagnostics of malignant tumors in children (abstract). *Medical Pediatric Oncology* 1995; 25 (4):137.
 19. FROSTAD B, MARINSSON T, DAMIFORS C, TANI E, FALKMER V, KOGNER P. Fine needle aspiration for rapid genotyping of neuroblastoma using FISH and image cytometry (abstract). *Medical Pediatric Oncology* 1988; 31 (4): 291.
 20. NAKIĆ M, ČEPULIĆ M, PETKOVIĆ I, STEPAN J, MILIĆ Ž, VRDOLJAK J. Advantages of Cytologic Analysis in the Diagnosis of Neuroblastoma in Children (abstract). *Medical Pediatric Oncology* 1988;31 (4):356.
 21. WHITE VA, FANNING CV, AYALA AG, RAYMOND AK, CARASCO CH, MURRAY JA. Osteosarcoma and the role of fine needle aspiration. A study of 51 cases. *cancer* 1988; 62:1238-46.
 22. LAYFIELD LJ, GLASGOW BJ, ANDERS KH, MIRRA JM. Fine-needle aspiration cytology of primary bone lesions. *Acta Cytol* 1987; 31:177-84.
 23. PERLMAN EJ, DICKMAN PS, ASKIN FB, GRIER HF, MISRE JS. Ewing's sarcoma-routine diagnostic utilisation of MIC 2 analysis. A Pediatric Oncology Group/Children's cancer Group Intergroup Study. *Hum Pathol* 1994;25: 304-7.
 24. NAKIĆ M, ČEPULIĆ M, PETKOVIĆ I, STEPAN J, MILIĆ Ž, LENIČEK J. Fine needle aspiration cytology (FNAC) in diagnosis of osteosarcoma and Ewing's sarcoma (abstract). *Medical Pediatric Oncology* 1996;27 (4):309.
 25. MAUER E, HAROLD M. Rhabdomyosarcoma. *Pediatric Cancer Therapy*, ed Carl Pochedly, New York, 1979:71-85.
 26. ČEPULIĆ M, NAKIĆ M, ČEPULIĆ E. Solidni maligni tumori u dječjoj dobi. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. *Klinička onkologija*, Zagreb: Globus, 1996; 813-21.
 27. BLOUSTEIN P, SILVERBERG SG. Rapid cytologic examination of surgical specimens. *Pathol Ann* 1977; 12:251-78.
 28. LIU FJ, DUBEN-VON LAUFEN JL, BISHOP ML. Tumor markers. *Clinical Chemistry*. Philadelphia: 1985:495-504.
 29. JACOBS EL, HASKEL CM. Clinical use of tumor markers in oncology. *Curr Probl Cancer* 1991; 299-359.
 30. WAGENER C. Diagnostic sensitivity, diagnostic specified predictive value of the determination of tumor markers. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22:969-79.
 31. WAGNER C, HOSSFELD KD. Analytical and dyagnostic validity of tumor markers. *Onkologie* 1996; 2:278-86.
 32. GERMA JR, LIANOS M, TABERNERO JM, MORA J. False elevations of alpha-fetoprotein associated with liver disfunction in germ cell tumors. *Cancer* 1993; 72:2491-4.
 33. BENCHIMOL S, FUKS A, JOTHY S, BEAUCHEMIN N, SHIROTA K, STANNERA CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intracellular adhesion molecule. *Cell* 1989; 57:327-34.
 34. TATE P. Plasma CEA in the post-surgical monitoring of colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1982;46:323-30.
 35. STEIBER P. Possible use of tumor markers in tumor monitoring. *Der Bay Int* 1996;16:42-54.
 36. LAMERZ R. CA 19-9, GICA (gastrointestinal cancer antigen). In: Sell St, ed. *Serological cancer markers*. Totowa: Humana Press, 1992:309-39.
 37. KENEMANS P, VERSTRAETEN AA, VON KAMP GK, VON MENSENDORFF-PUOILLY S. The second generation CA 125 assays. *Ann Med* 1995;27:107-13.
 38. SOLE LA, COLOMER R, NAVARRO A, ENCABO G. CA 15-3: early results of a breast cancer marker. *Anticancer Res* 1986;6:683-4.
 39. GION M, PLEBANI M, MIONE R, PENZO C, MEO S, BURLINA A. Serum CA 549 in primary breast cancer: comparison with CA 15-3 and MCA. *Br J Cancer* 1994; 69:721-5.
 40. KANTOFF PW, TALCOT JA. The prostate specific antigen. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994;8:555-72.
 41. MOLINA R, AUGUST C, FILELLA X, JO J, JOSEPH J, GIMENEZ N, BALLESTA A. Study of a new tumor marker, CYFRA 21-1, in malignant and nonmalignant disease. *Tumor Biol* 1994; 15:318-25.
 42. STURK A, SANDERS GTB. Makroenzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;28:65-81.
 43. CASTALDO G, ORIANI G, CIMINO L, et al. Serum lactate dehydrogenase isoenzyme 4/5 ratio discriminates between hepatocarcinoma and secondary liver neoplasia. *Clin Chem* 1991;37:1419-23.
 44. BURGHUBER OC, WOROFKA B, SCHERNTHANER G, VETTER N, NEUMAN M, DUDACK R, KUZMITZ R. Serum neuron specific enolase as a useful tumor marker for small cell lung cancer. *Cancer* 1990;65:1386-90.
 45. MANN K, SALLER B, HOERMANN R. Clinical use of hHCG and hCG determinations. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;53 (Suppl 216):97-104.